

発芽コムギ胚におけるサッカラーゼ 活性について

2. サッカラーゼ活性に影響を及ぼす種々の 要因について

寺 岡 宏

前報(1)において、発芽コムギ胚における発育の特性を炭水化物代謝の面から明らかにするため生長とサッカラーゼ活性との関係が研究された。その結果、生長の盛んな部分ほど強いサッカラーゼ活性を示すことが明らかにされた。

以上の結果から生体内において、生長を促進する要因が同時にサッカラーゼ活性に対しても、促進的な影響を及ぼすのではないかと考えられる。今回の実験においては以上の観点を明らかにするため、発芽胚中にふくまれ、生長を促進すると考えられる二、三の物質をえらび、これらの物質がサッカラーゼ活性に及ぼす影響について実験した。

方 法

実験材料としては秋まきコムギ赤さび不知1号を用いた。

ウスブルン溶液で滅菌した種子をシャーレに入れ水にひたして24°～26°Cで暗中で発芽させた。発芽2日目以後の胚は幼根を有するが、実験においては幼根の部分は切除した。使用目的によつて胚盤、子葉鞘、子葉をふくむ部分を発芽胚として用いる場合と、子葉鞘のみを用いる場合がある。

サッカラーゼ活性の測定には次のような条件のもとで反応を行つた。反応温度38°C, 反応時間30分～60分, M/50 pH 5.31 クエン酸緩衝液, 基質: 最終濃度3%サッカロース溶液, 酵素液としては植物材料を水を

加えてすりつぶし、これを3000r. p.m. で遠心分離する。この上澄液を直接粗酵素液として用いる場合と、上澄液を飽和硫酸アンモニウムに加えて蛋白質を沈澱させ、沈澱物を再び水にとかして12~20時間流水中で透析したものを用いる場合とがある。

反応終了後は加熱によつて酵素活性を失脚させ、反応液中における還元糖の生成量 (mg) によつてサッカラーゼ活性を示した。還元糖の定量はハーネス法(2)を用いた。

結 果

1. 子葉鞘抽出液のサッカラーゼ活性に及ぼす影響

子葉鞘中にふくまれる或る種の物質が直接サッカラーゼによる反応を促進する可能性及びサッカラーゼ活性の生長にともなう増加を促進する可能性が考えられる。これらの点を明らかにするため子葉鞘抽出液を用いて、サッカラーゼ反応に及ぼす影響について実験した。

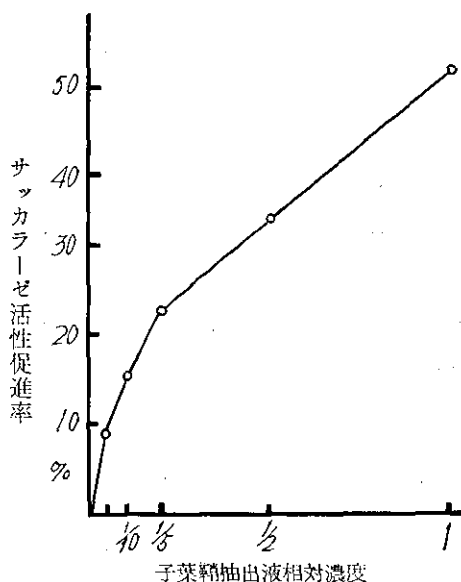


図 1 子葉鞘抽出液のサッカラーゼ活性への影響

4日目発芽胚からの子葉鞘110個(生体重量4.6g)を水中で加熱して酵素活性を失脚させたのち、水を加えてすりつぶし、8 mlの抽出液をとる。この抽出液の濃度を1とし、これを1/2, 1/5, 1/10, 1/20にそれぞれ希釈し、サッカラーゼ活性に対する影響を比較した。反応には抽出液1.5mlを用い、反応液の総量は5.0mlである。

実験の結果は図1に示されているように、子葉鞘の抽出液中にはサッカラーゼによる反応を促進する物質が存在し、その促進効果は可成り微量な濃度においても有効であることが明らかにされた。

2. β インドール醋酸のサッカラーゼ活性に及ぼす影響

発芽胚にふくまれ、生長を促進する物質として β インドール醋酸が考えられる。発芽4日目40個の子葉鞘からの透折した酵素液を用い、 $10^{-3}M \sim 10^{-8}M$ の β インドール醋酸の添加による影響を実験した。

表1 サッカラーゼ活性に及ぼす β インドール醋酸の影響

β インドール醋酸濃度	$10^{-3}M$	$10^{-4}M$	$10^{-5}M$	$10^{-6}M$	$10^{-7}M$	$10^{-8}M$	—
サッカラーゼ活性 mg/30分	28.1	28.7	26.4	27.6	27.6	27.3	29.7
活性比 %	94.6	96.6	89.0	92.9	92.9	91.9	100

実験の結果は表1に示されているようにサッカラーゼ反応に対して、 β インドール醋酸は直接的な促進作用は及ぼさないことが明らかにされた。

次に子葉鞘の伸長に共軛したサッカラーゼ活性の増加に及ぼす β インドール醋酸の影響を明らかにするため、発芽3日目の子葉鞘を用いて実験を行つた。子葉鞘の先端2～3mmを切除した後、 $24^{\circ}C$ 暗中で5時間水に浮べた後再びその先端部4～5mmを切除する。この子葉鞘を先端から10mmの長さに切る。この子葉鞘切片を $10^{-3}M \sim 10^{-8}M$ β インドール醋酸をふくむシヤールに入れて $24^{\circ}C$ 約20時間暗中で放置した後、子葉鞘切片の伸長及びサッカラーゼ活性を測定した。対照としては同様の切片

を水にひたして同一条件のもとで放置したものを用いた。

実験の結果は図2に示されているように、 β インドール醋酸によつて子葉鞘の伸長は促進されるが、これに共軛するサッカラーゼ活性の増加は阻害されることが明らかにされた。

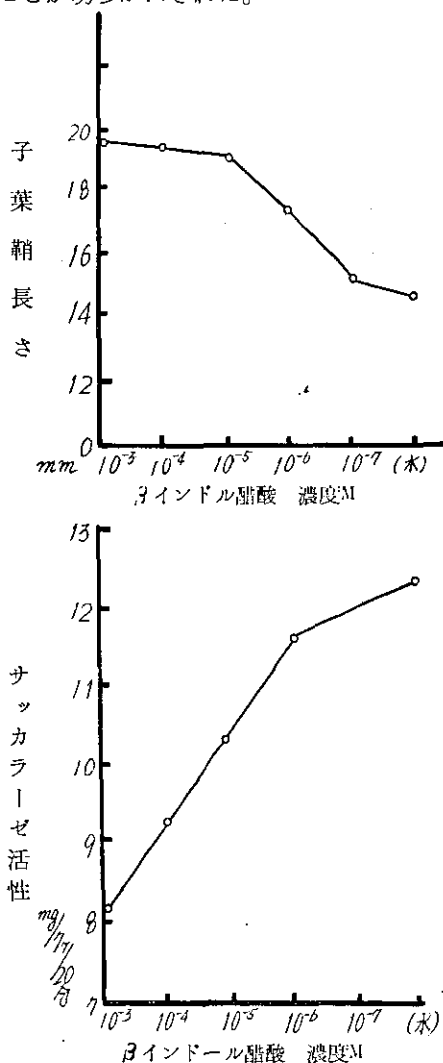


図2 子葉鞘伸長及びサッカラーゼ活性の変化におよぼす β インドール醋酸の影響

これらの結果は伸長と共軛するサッカラーゼ活性の増加を促進する要因としては β インドール醋酸は考えられないこと及び子葉鞘の伸長の盛んな部分には β インドール醋酸の阻害作用に拮抗してサッカラーゼ活性を促進する他の要因が存在することを暗示する。

前報(1)においてサッカラーゼの存在様式として、水溶性及び不溶性のものがあることが明らかにされ。この両者の活性比が子葉鞘の伸長と関連を有することがみられた。これらの現象に対して β インドール醋酸が及ぼす影響について、次の実験を行つた。発芽3日目の子葉鞘から前述の方法に従つて10mmの切片をつくり、これを種々濃度の β インドール醋酸液に24°C 約20時間暗中でひたした。処理後サッカラーゼ活性を水溶性及び不溶性にわけて測定した。対照としては同一条件下において水にひたしたものを用いた。種々の濃度における β インドール醋酸処理による、サッカラーゼ活性の増加量は表2及び図3に示されている。

表2 子葉鞘における水溶性及び不溶性サッカラーゼ活性の増加に及ぼす β インドール醋酸の影響

		サッカラーゼ活性 mg/30 子葉鞘片/30分		活 性 比 %		子葉鞘 長さ mm
		不 溶 性	水 溶 性	不 溶 性	水 溶 性	
処 理 前		19.3	86	18.5	81.5	10.0
処理 醋酸 濃度 	10 ⁻⁴ M	29.7	109	21.5	78.5	21.0
	10 ⁻⁵ M	29.7	124	19.5	80.5	20.0
	10 ⁻⁶ M	32.7	140	18.2	81.2	18.0
	10 ⁻⁷ M	34.2	156	18.0	82.0	16.5
	(水)	34.2	154	18.2	81.8	16.5

以上の結果から明らかなように、水溶性対不溶性のサッカラーゼ活性比は β インドール醋酸処理濃度によつては殆んど変化しないことが明らかにされた。以上の結果は β インドール醋酸が水溶性及び不溶性のサッカラーゼ活性の増加に対して同程度の阻害を示すことによるものである。

β インドール醋酸について以上なされた実験の結果は、伸長生長と同

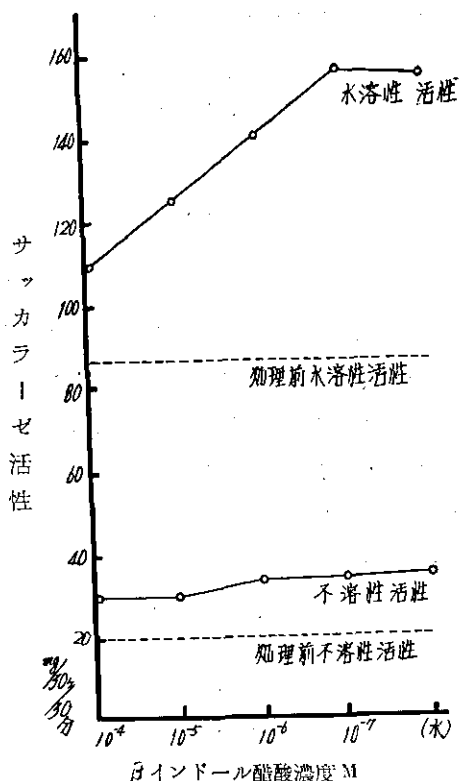


図3 子葉水溶性及び不溶性サッカラーゼ活性の変化に及ぼすβインドール醋酸の影響

時にサッカラーゼ活性を促進する要因としてのβインドール醋酸の可能性に対して否定的な結論をあたえるものといえる。

3. アスコルビン酸のサッカラーゼ活性に及ぼす影響

発芽4日目の胚からの透折した粗酵素液を用い、反応液に10mg/ml, 1mg/mlのアスコルビン酸を添加しサッカラーゼ反応に及ぼす影響を実験した。

実験の結果は表3に示されているように、アスコルビン酸による直接の反応の促進効果はみとめられず、逆に幾分かの阻害作用がみられた。

表 3 サッカラーゼ活性に及ぼすアスコルビン酸の影響

No.	アスコルビン酸濃度	サッカラーゼ活性 mg/40分	
		アスコルビン酸 -	アスコルビン酸 +
1	1mg/ml	10.3	9.4
2	10mg/ml	14.4	13.8

次に伸長に共輓したサッカラーゼの活性の増加に及ぼすアスコルビン酸の影響をしらべるため、発芽3日目の胚から前述の方法にしたがつて10mmの子葉鞘切片をつくり、これを種々の濃度のアスコルビン酸溶液に24°C暗中で約20時間ひたした。処理後各切片のサッカラーゼ活性を測定した。実験にはアスコルビン酸溶液と更にこれに2%サッカロース溶液をふくむものを用いてその効果を比較した。

表 4 子葉鞘サッカラーゼ活性の変化に及ぼすアスコルビン酸の影響

アスコルビン酸濃度 mg %	サッカラーゼ活性 mg/1ヶ/60分	
	1%サッカロース	-
0	4.0	4.2
10	4.0	4.4
25	3.5	5.3
50	3.3	5.0
100	2.2	4.8
200	2.2	4.8

実験の結果は表4に示されているように処理液に2%サッカロースが存在する場合と、存在しない場合によつてアスコルビン酸の影響は異なる。即ちサッカロースの存在しない場合、アスコルビン酸はサッカラーゼ活性の増加を促進する作用を示し、その効果はアスコルビン酸25mg%の濃度において最も顕著である。これに比較し、サッカロースの存在する場合にはアスコルビン酸はサッカラーゼ活性の増加を阻害する。

他の実験において、

(1) 20mg%アスコルビン酸+ 10^{-4} M β インドール醋酸

(2) 20mg%アスコルビン酸+ 10^{-4} M β インドール醋酸

+1%サッカロース

の溶液に子葉鞘切片を作用させ、サッカラゼ活性の増加に対する影響を実験した。その結果は、(1), (2)の条件の下ではいずれもサッカラゼの増加に対しては顕著な影響を及ぼさないことが明らかにされた。

4. ギベレリン酸のサッカラゼ活性に及ぼす影響

発芽3日目の胚からの透折した酵素液を用い、種々の濃度のギベレリン酸を反応液に添加してサッカラゼ活性に及ぼす影響を実験した。

表5 サッカラゼ活性に及ぼすギベレリン酸の影響

ギベレリン酸濃度	mg/l	サッカラゼ活性	mg/50分
	0		23.6
	0.1		23.7
	1.0		24.3
	10.0		24.5

実験の結果は表5に示されているように、サッカラゼ反応に対してギベレリン酸は殆んど影響を及ぼさないことがわかる。

次に伸長と共働したサッカラゼ活性の増加に及ぼすギベレリン酸の影響を明らかにするため実験を行つた。即ち前述の方法にしたがつて、

表6 子葉鞘サッカラゼ活性の変化に及ぼすギベレリン酸の影響

	処 理 前	処 理 後		
		ギベレリン酸 ナシ	ギベレリン酸 1mg/l	ギベレリン酸 10mg/l
子 葉 鞘 長 さ mm	10.0	12.3	13.5	13.5
伸 長 率 %	—	23	35	35
サッカラゼ活性 mg/10g/30分	37.0	60.5	72.5	74.0
増 加 率 %	—	64	96	100

発芽3日目の10mmの子葉鞘切片をつくり、これをギベレリン酸溶液に約20時間、24°C、暗中でたひした後、伸長及びサッカラーゼ活性を測定した。その結果は表6に示されているように、ギベレリン酸は子葉鞘切片の伸長を促進すると同時に、これと共働したサッカラーゼ活性の増加を顯著に促進することが明らかにされた。

考 察

前報(1)において明らかにされた、子葉鞘伸長と共働したサッカラーゼ活性の増加現象の説明として、本論文においては子葉鞘の伸長を促進する物質が同時にサッカラーゼを活性化することを仮定し、その可能性を3インドール醋酸、アスコルビン酸、及びギベレリン酸について検討した。その結果、3インドール醋酸については全く否定的な結論が得られ伸長の促進と同時にサッカラーゼ活性の増加を阻害することが明らかにされた。又アスコルビン酸についてはサッカロースの存在何如によつてその影響がことなり、サッカロースの存在しない時には促進作用をもつことが見出されたが、その効果は顯著ではない。以上の二つに比べてギベレリン酸は顯著に子葉鞘伸長と共働したサッカラーゼ活性の増加を促進することが明らかにされた。以上の結果から発芽コムギ胚における伸長及び炭水化物代謝に影響を及ぼす要因としてのギベレリン酸の生理的意義が考えられる。以上の現象におけるギベレリン酸の作用機構については今後の課題として残されている。

ギベレリン酸の炭水化物代謝におよぼす影響については、L. G. Palgによつてギベレリン酸処理オオムギの発芽胚乳において還元糖の生成が促進されること(3)及びこれがアミラーゼ活性の促進によること(4)が見出されている。これらの結果は本論文における結果と同様に炭水化物代謝に及ぼすギベレリン酸の促進作用を示すものであり、発芽胚における生理的特性を炭水化物代謝の面から解明しようとする場合、ギベレリン酸が一つの重要な要因として存在することを示すものである。即ち前報(5)

において24°C発芽コムギ胚の生理的特性を発芽2〜3日をさかいとして前期と後期とに区別し、サッカラゼの活性化によつて前期から後期への転換が行われることを明らかにしたが、更にサッカラゼの活性化を支配する要因としてのギベレリン酸が見出された。

この結果、発芽胚における生理的特性の転換を支配する物質としてギベレリン酸の存在が、重要な意義を有することが考えられる。

結 論

発芽コムギ胚のサッカラゼ活性に及ぼす β インドール醋酸、アスコルビン酸、ギベレリン酸の影響について実験した。その結果次の点が明らかにされた。

3 インドール醋酸は子葉鞘の伸長に共働したサッカラゼ活性の増加を阻害する。

アスコルビン酸は子葉鞘の伸長と共働したサッカラゼ活性の増加に対してサッカロースの存在しない場合は多少の促進作用を示し、サッカロースの存在する場合は阻害作用を示す。

ギベレリン酸は子葉鞘の伸長と共働したサッカラゼの活性の増加を促進する。

発芽胚における胚の生理的特性とギベレリン酸との関係について、いくらかの考察をおこなつた。

文 献

- (1) 寺岡 北星短大紀要 7. 1. (1961)
- (2) C.S.Hanes: Biochem. J. 23, 99 (1929)
- (3) L.G.Paleg: Plant Physiol. 35-3. 273 (1960)
- (4) L.G.Paleg: Plant Physiol. 35-6. 902 (1961)
- (5) 寺岡 北星短大紀要 6. 62. (1960)